

氏名（本籍）	ひらの りょうへい 平野 良平（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 296 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	臨床応用を指向した 1 点採血による血中 6 β -hydroxycortisol/cortisol 濃度比を用いたヒト <i>in vivo</i> CYP3A 活性評価法の開発と応用
論文審査委員	（主査）准教授 柴崎 浩美 教授 平塚 明 教授 平野 俊彦

論文内容の要旨

薬物代謝酵素シトクロム P450 3A (CYP3A) は、臨床で使用されている医薬品の約半数の代謝に関与しており、活性の個人差は 5 ~ 20 倍にもなる。CYP3A 活性を治療に先立ち評価することは、初回から適切な投与量や投与間隔の提案を可能とする。特に、活性が著しく低下した患者を発見し、投与量を予め調節することは重篤な副作用の回避につながり、安全で有効な個別化薬物治療に有用である。CYP3A 活性は年齢や性別、食生活などの環境的要因の影響を大きく受けるため、その活性評価には酵素活性を直接評価するフェノタイピングが用いられる。テスト薬物の投与や頻回の採血が必要なフェノタイピング法は、患者の負担が大きく、臨床応用には至っていない。そのため、臨床検査のように簡便で、かつ正確な CYP3A 活性評価法の開発が望まれる。また、医薬品開発においても簡便で正確な活性評価法の提供は、薬物代謝酵素の関与する相互作用を検討する臨床相互作用試験の進行を迅速にする。さらに近年、地域医療構想の中で在宅医療の充実が求められるとともに、高齢化に伴う健康寿命への関心も高まっている。2014 年 4 月より薬局における自己採血検査が認められ、HbA1c などの検査が開始された。CYP3A 活性評価が病院だけでなく薬局でも可能となれば、地域医療における副作用の未然予防など、薬剤師による薬学的管理の有用な手段となる。

内因性 cortisol は CYP3A により 6 β -hydroxycortisol (6 β -OHF) へ代謝される。著者は、正確で簡便かつ迅速な CYP3A 活性の指標として血中の 6 β -OHF と cortisol の濃度比に着目した。*in vivo* 酵素活性評価では、薬物や内因性物質が生体内で当該酵素によって代謝物へ変換する部分代謝クリアランスが当該酵素の活性を反映する最も信頼性の高い指標とされる。著者の研究室では、既に cortisol から 6 β -OHF への部分代謝クリアランスである内因性 cortisol の 6 β -水酸化代謝クリアランス (CL_{m(6 β)}) を指標とした *in vivo* CYP3A 活性評価法を開発している。血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比を CYP3A 活性の

指標として活用するためには、この血中濃度比が $CL_{m(6\beta)}$ と相関することが前提となる。また、cortisol から CYP3A による 6 β -OHF への代謝は cortisol 代謝のうちわずか 1% であり、6 β -OHF は速やかに尿中に排泄されるため、血中 6 β -OHF 濃度は非常に低く、これまで正確な定量法の報告はない。本研究では、CYP3A 活性評価の臨床における実用化を目指し、LC-MS/MS による血中 6 β -OHF と cortisol の同時微量定量法を確立し、血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比が正確な CYP3A 活性評価の指標となるかを $CL_{m(6\beta)}$ と比較することにより検討した。さらに、自己採血法を用いた活性評価法についても検討した。なお、本研究は「東京薬科大学薬学部・ヒト組織を研究活用するための倫理審査委員会」の承認を得ており、被験者および患者には研究の目的および方法について説明の上、文書にて同意を得た。

第 1 章 血中 6 β -hydroxycortisol と cortisol の LC-MS/MS による同時微量定量法の開発

安定同位体標識体 (6 β -OHF- 2H_4 , cortisol- $^{13}C_4$) を内標準物質とした LC-MS/MS 法を用いた。6 β -OHF と cortisol をピコリン酸誘導体とし、プロトン親和力を高めることで Electrospray ionization positive ion mode (ESI (+)) でのイオン化を促進させ、38.51 pg/mL (6 β -OHF), 38.10 pg/mL (cortisol) までの定量を可能とした (ピコリン酸誘導体化法)。健常成人の血中 6 β -OHF 濃度は 0.747 ± 0.002 ng/mL と非常に低かった。この血漿に標品 6 β -OHF を 0.822 ng あるいは 1.232 ng を添加した時の相対誤差 (R.E.) は -5.41%, -4.14%, 相対標準偏差 (R.S.D.) は 3.76% 以下と良好であった (Table 1)。また、cortisol も同様に良好な精度・再現性を示した。

Table 1 Accuracy and precision using picolinyl derivatization method (n = 6)

	Added (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Mean \pm S.D.	R.E. ^a (%)	R.S.D. ^b (%)
6 β -OHF	—	—	0.747 ± 0.002	—	2.06
	0.822	1.569	1.484 ± 0.039	-5.41	2.63
	1.232	1.979	1.897 ± 0.071	-4.14	3.76
cortisol	—	—	63.65 ± 2.19	—	3.44
	40.44	104.09	105.84 ± 2.34	1.68	2.20
	80.88	144.53	149.46 ± 3.13	3.41	2.09
			^a Relative error	^b Relative standard deviation	

Table 2 Accuracy and precision using nonderivatization method (n = 6)

	Added (ng/mL)	Expected (ng/mL)	Mean \pm S.D.	R.E. ^a (%)	R.S.D. ^b (%)
6 β -OHF	—	—	0.420 ± 0.016	—	3.92
	0.822	1.242	1.183 ± 0.035	-4.73	2.99
	1.232	1.652	1.571 ± 0.028	-4.90	1.80
cortisol	—	—	38.36 ± 0.12	—	0.32
	40.44	78.80	78.25 ± 0.82	-0.70	1.04
	80.88	119.24	119.47 ± 0.49	0.19	0.41
			^a Relative error	^b Relative standard deviation	

さらに、臨床で

の使用を考慮し、より簡便な LC-MS/MS による誘導体化しない定量法 (非誘導体化法) を開発した。イオン化法を ESI negative ion mode とし、ギ酸付加体をモニターした。カラム、移動相、流速、注入量を検討した結果、ピコリン酸誘導体化法と同等の濃度まで定量可能となった。非誘導体化法の R.E. は -4.90% ~ 0.19%, R.S.D. は 3.92% 以下であり、良好な精度・再現性が得られた (Table 2)。非誘導体化法は簡便かつ迅速な定量が可能で臨床応用性が高く、ピコリン酸誘導体化法は分析機器の感度が充分でない場合や CYP3A 活性の低下により血中 6 β -OHF 濃度が極めて低い場合に有効である。

第 2 章 血中 6 β -hydroxycortisol/cortisol 濃度比による CYP3A 活性評価法の開発

健常成人女性 3 名を対象に、CYP3A 活性阻害作用を持つ経口避妊薬 (ethinylestradiol, levonorgestrel 含有) 服用による血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比の変化を検討した。経口避妊薬は 21 日間服用した後 7 日間休薬した。採血は、服用前日 (Day 0), 服用 1 日目 (Day

1), 服用 21 日目 (Day 21), 休薬 7 日目 (Day 28) に 8 時または 10 時から 18 時まで 1 時間ごとに行った. Subject A の血中 6β -OHF 濃度は $0.165 \sim 1.781$ ng/mL であり, 各採血点における血中 cortisol 濃度 ($51.82 \sim 305.11$ ng/mL) の $0.5\% \sim 1.0\%$ と代謝の寄与を反映していた (Fig. 1). Subject B, C の血中 6β -OHF 濃度も同様に $0.173 \sim 1.497$ ng/mL の範囲で推移した. また, 3 名の血中 6β -OHF 濃度の推移は cortisol のそれと類似していた. Fig. 2 には Subject A における血中 6β -OHF/cortisol 濃度比の推移を $CL_{m(6\beta)}$ と合わせて示した. Subject A の血中 6β -OHF/cortisol 濃度比は Day 0 では 0.0077 ± 0.0013 , Day 1 では 0.0097 ± 0.0019 と変化はなかった. Day 21 では 0.0047 ± 0.0012 と Day 0 の 61% に低下した. 血中 6β -OHF/cortisol 濃度比と $CL_{m(6\beta)}$ の挙動はほぼ等しく, 経口避

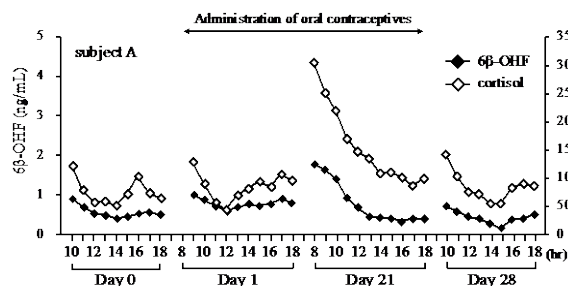


Fig. 1 Plasma concentrations of 6β -OHF and cortisol

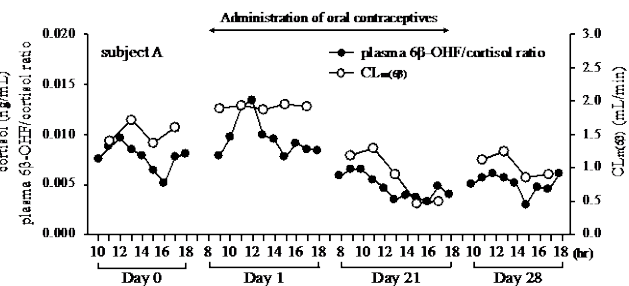


Fig. 2 Plasma 6β -OHF/cortisol ratio and $CL_{m(6\beta)}$

妊薬服用による低下率も $CL_{m(6\beta)}$ のそれ (57%) とほぼ等しかった. 同様に, Subject B, C においても Day 21 では Day 0 の 51% および 39% まで低下していた ($CL_{m(6\beta)}$ の低下: 46%, 41%). Day 28 では 7 日間の休薬により 3 名とも回復傾向にあったが服用前日までは戻っていなかった. $CL_{m(6\beta)}$ を x 軸, 血中 6β -OHF/cortisol 濃度比を y 軸とした回帰直線の相関係数は 0.9054 であり, 血中 6β -OHF/cortisol 濃度比の *in vivo* CYP3A 活性評価の指標としての妥当性を実証した (Fig. 3).

健常成人 2 名を対象に 1 年間にわたり, 約 28 日間ごとに血中 6β -OHF/cortisol 濃度比を測定した日間変動は 1.9 倍, 1.4 倍であり, 10 時から 18 時までの日内変動は 1.2 ~ 2.5 倍であった. また, 健常成人 22 名 (男性: 10 名, 女性: 12 名, 年齢: 22 ~ 55 歳) を対象に血中 6β -OHF/cortisol 濃度比の正常値データを集積した. 血中 6β -OHF/cortisol 濃度比の範囲は $0.0059 \sim 0.0172$ であり, 個人間変動は 2.9 倍であった. これらの結果は, 健常成人の $CL_{m(6\beta)}$ の日内および日間変動 (1.5 ~ 3.0 倍), 個人間変動 (3.5 倍) の範囲内であった.

さらに, 本法の臨床応用として, 杏林大学医学部附属病院腫瘍内科にてタキサン系抗がん薬ドセタキセルで治療を行なった患者 20 名を対象に血中 6β -OHF/cortisol 濃度比を測定した. 1 名の患者では血中 6β -OHF 濃度が 3.8 ng/mL と健常成人の 2 ~ 15 倍と高く, 血中 6β -OHF/cortisol 濃度比 (0.0267) も高かった. 他の 19 名では $0.0065 \sim 0.0180$

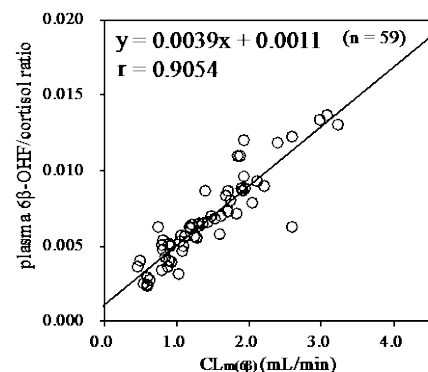


Fig. 3 Correlation between $CL_{m(6\beta)}$ and plasma 6β -OHF/cortisol ratio

と健常成人の範囲とほぼ等しかった。患者の血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比とドセタキセルの全身クリアランス (CL_{DTX}) の相関性を検討した結果、相関性は十分でなかった (Fig. 4)。これまで CYP3A 活性と CL_{DTX} の相関に関する複数の報告があるが、いずれも年齢や生化学検査値などの交絡因子が必要とされている。本法では 1 点採血で活性評価できることからドセタキセルの体内動態検討と同じポイントでの CYP3A 活性評価が可能である。投与中の血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比を測定したところ、20 名中 2 名に急激な低下が見られ、CYP3A 活性と CL_{DTX} との相関性に影響を与えている可能性が示唆された。ドセタキセルのヒトにおける CYP3A 活性への影響についての報告はなく、このような患者の存在は初めて明らかとなった。

第 3 章 Dried blood spots 法を用いた血中 6 β -hydroxycortisol/cortisol 濃度比による CYP3A 活性評価法の開発

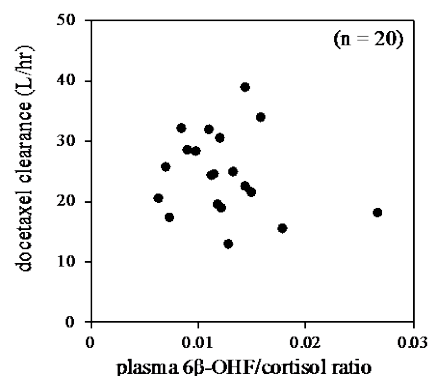


Fig. 4 Correlation between plasma 6 β -OHF/cortisol ratio and docetaxel clearance

Dried blood spots (DBS) 法は自己採血法のひとつであり、患者自らが手指を穿刺し、血液をろ紙に滴下する。測定には乾燥して保存したスポット部分を切り出して用いる。DBS 法では全血を試料とするが、全血には血漿と血球が含まれている。6 β -OHF と cortisol の血漿中と血球中の分布割合が異なる場合、全血中と血漿中では血中濃度比が異なってくる。そこで、被験者 2 名を対象に、左右の手指からの DBS および静脈血からの全血と血漿の採取を同時に行い、6 β -OHF と cortisol を定量、比較した (Table 3)。Subject A の 6 β -OHF は DBS では 0.0455 ng であり、全血中濃度 (0.441 ng/mL) の 1/10 の値であった。血漿中の濃度は 0.577 ng/mL であり、ヘマトクリット値を考慮して血漿中に分布する 6 β -OHF の割合は 65% と算出した。同様に cortisol が血漿中に分布する割合は 85% と算出した。この割合は 2 名ともほぼ等しかった。6 β -OHF と cortisol の血漿中の分布の割合が異なるため、DBS 中の血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比は血漿中のそれよりも高い値を示した。次に、健常成人 6 名を対象に同時刻に得た血漿と DBS について血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比を算出した (n=10)。血漿より得られた値を x 軸に、DBS より得られた値を y 軸にプロットしたところ、 $r = 0.9548$ と高い相関性が得られ、DBS 法を利用した場合でも血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比はヒト *in vivo* CYP3A 活性の正確な指標となることを確認した (Fig. 5)。

Table 3 Amount of 6 β -OHF and cortisol and 6 β -OHF/cortisol ratio in two healthy subjects

	Subject A				Subject B			
	DBS (ng)		Whole blood (ng/mL)	Plasma (ng/mL)	DBS (ng)		Whole blood (ng/mL)	Plasma (ng/mL)
	Left hand	Right hand			Left hand	Right hand		
6 β -OHF	0.0455	0.0440	0.441	0.577	0.0566	0.0560	0.636	0.810
cortisol	3.37	3.33	30.47	48.88	4.18	4.54	44.20	74.49
6 β -OHF/cortisol ratio	0.0135	0.0132	0.0145	0.0118	0.0135	0.0123	0.0144	0.0109

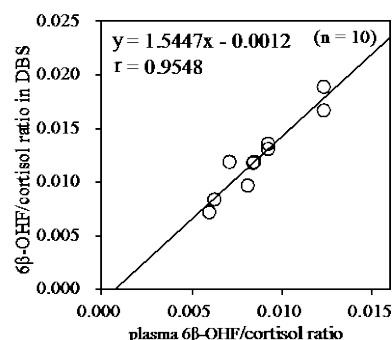


Fig. 5 Correlation between plasma 6 β -OHF/cortisol ratio and 6 β -OHF/cortisol ratio in DBS

以上,本研究では1点採血による血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比を用いた *in vivo* CYP3A 活性評価法を開発した. 本法は CL_{m(6 β)} と同等の正確性と, 1点採血または DBS 採取から活性評価できる迅速性・簡便性を併せ持っており, 臨床における実用化が可能である. また, 本法はテスト薬物の投与の必要がなく, 1点採血から算出できることから, 連続的な CYP3A 活性評価が可能であり, 臨床試験や治験などの医薬品開発分野にも有効である. さらに, DBS 法による病院外でも可能な活性評価法は, 今後, 薬局が中心となって推進していく在宅医療, 地域医療など幅広い分野へ CYP3A 活性評価を提供でき, 安全で有効な個別化医療に貢献できると考える.

【研究結果の掲載誌】

Hirano R, Yokokawa A, Furuta T, Shibasaki H, *J Mass Spectrom*, **53**, 665-74 (2018)

論文審査の結果の要旨

薬物代謝酵素シトクロム P450 3A (CYP3A) 活性を治療に先立ち評価することは、初回から適切な投与量や投与間隔の提案を可能とする。CYP3A の関与する薬物動態には 5~20 倍の個人差があることが知られているが、遺伝子多型診断によって CYP3A 活性を予測できないためフェノタイピングを行う必要がある。CYP3A フェノタイピング法としてミダゾラム等のテスト薬物のクリアランスが検討されているが、治療に不要なテスト薬物を投与すること、複数回の採血が必要となることから、患者への負担が大きい。内因性の cholesterol や cortisol を指標とする方法も提案されているが、侵襲性が低く、迅速かつ正確に活性評価する方法は無く、臨床応用に至っていない。

本研究で申請者は、実臨床で使用可能なヒト *in vivo* CYP3A 活性評価法の確立を目指し、血中 6 β -hydroxycortisol (6 β -OHF)/cortisol 濃度比に着目し、血中 6 β -OHF と cortisol 濃度の同時定量法を確立し、血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比の指標としての妥当性を実証した。さらに、より低侵襲的な乾燥ろ紙血 (DBS) を試料に用いた血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比による活性評価法を確立した。

第 1 章「血中 6 β -hydroxycortisol と cortisol の LC-MS/MS による同時微量定量法の開発」では、安定同位体標識体を内標準物質として、ピコリン酸誘導体化法と非誘導体化法の 2 種の方法による、血中の 6 β -OHF と cortisol 濃度の高精度微量定量法を開発した。ピコリン酸誘導体化法では、ピコリン酸が 21 位に 1 分子導入されていることを MS および NMR にて同定した。本法で測定した、健常成人の血中 6 β -OHF 濃度は 0.173–1.653 ng/mL と極めて低濃度であることを確認している。

第 2 章「血中 6 β -hydroxycortisol/cortisol 濃度比による CYP3A 活性評価法の開発」では、申請者の研究室で開発された cortisol の CYP3A による 6 β -OHF への部分代謝クリアランス ($CL_{m(6\beta)}$) をリファレンスメソッドとして、血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比の CYP3A 活性評価の指標としての妥当性を検討した。CYP3A 阻害作用のある経口避妊薬を服用した 3 名の被験者における CYP3A 活性の低下率は、 $CL_{m(6\beta)}$ では 41%–57%、6 β -OHF/cortisol 比では 39%–61% と一致した。さらに、両方法の相関係数は 0.9054 と良好であり、血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比の CYP3A 活性の指標としての妥当性を実証した。また、健常成人 2 名における 1 年間にわたる日間および日内変動の幅を明らかにするとともに、健常成人 22 名の正常値データ (0.0093 \pm 0.0030: 0.0059–0.0172) を集積した。さらに、杏林大学病院 腫瘍内科にて、抗がん薬ドセタキセルで治療を行う患者を対象に CYP3A 活性評価を行い、CYP3A 活性の低い患者ではドセタキセルクリアランスが低い傾向にあること、本法は投与中の活性評価も可能であることを示した。本研究結果から、1 点の採血から得られる血中 6 β -OHF/cortisol 濃度比が CYP3A 活性の指標として臨床応用可能であることを示した。

第 3 章「Dried blood spots 法を用いた血中 6 β -hydroxycortisol/cortisol 濃度比による CYP3A 活性評価法の開発」では、より簡便で侵襲性の低い CYP3A 活性評価法として、自己採血法である DBS を血液試料とした 6 β -OHF/cortisol 比を検討した。DBS 試料は 60 μ L 程度の全血液であ

るため、6 β -OHF 含量は極めて低い。DBS からの抽出法の検討、1 章で開発した定量法の改良により極微量の定量を可能とした。DBS 中の 6 β -OHF は 50 pg 以下であった。全血液、血漿、DBS 中の 6 β -OHF と cortisol を定量し、それぞれの血中 6 β -OHF/cortisol 比を比較検討した。血球成分と血漿成分への 6 β -OHF と cortisol の分布の差より、DBS を試料とした血中濃度比は血漿を試料としたそれより高めの値となるが、両者は良好な相関性 ($r = 0.9548$) を示し、DBS による CYP3A 活性評価が可能であることを明らかにした。

以上、本研究では、1 回の採血あるいは自己採血法 (DBS) より得られた血液試料中の 6 β -OHF/cortisol 濃度比は CYP3A 活性評価の指標となることを実証し、新規 CYP3A 活性評価の指標として提案した。本研究内容は、実臨床で活用できる正確かつ迅速・簡便な CYP3A 活性評価法を提案したものである。投与に先立ち CYP3A 活性評価を行い、活性に基づき投与量を調節することは、個別化医療に直結するものである。また、本法は臨床試験や治験などの医薬品開発分野にも有効である。したがって博士 (薬学) の学位論文として相応しい価値のあるものと判断する。